

11/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI .
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

002493604

WPI Acc No: 1980-11619C/198007

Coenzyme-Q prodn. - by culturing a Pseudomonas microorganism, pref. P schuyllkilliensis

Patent Assignee: AIDA H (AIDA-I)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 55000028	A	19800105				198007 B
JP 81032916	B	19810730				198135

Priority Applications (No Type Date): JP 7863382 A 19780529

Abstract (Basic): JP 55000028 A

Coenzyme Q9 is produced by culturing a Q9-producing Pseudomonas microorganism in a culture medium contg. added is isopentenol and/or

geraniol and then recovering the prod.

The microorganism are pref. P. schuyllkilliensis IAM 1092 or IAM 1126. The prod. is active against various diseases and plays an important role in terminal electron transmission in living organisms.

Title Terms: COENZYME-Q; PRODUCE; CULTURE; PSEUDOMONAS; MICROORGANISM; PREFER; P

Derwent Class: B05; D16

International Patent Class (Additional): C12P-007/66; C12R-001/38

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C1; D05-C03

Chemical Fragment Codes (M1):

01 V800 G100 M531 L951 H541 H542 H711 H722 H723 M240 M232 M233 M331
M333 N130 M510 M520 M540 M720 M414 M902

Chemical Fragment Codes (M2):

02 K0 H5 H7 M282 M210 M211 M226 M231 M232 M240 M270 M311 M316 M320
G100

M531 L951 H541 H542 H711 H722 H723 N130 M510 M520 M540 M720 M414
M902

?

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55-28

⑤ Int. Cl.³
C 12 P 7/66
C 12 R 1/38

識別記号

庁内整理番号
6760-4B
6760-4B

④ 公開 昭和55年(1980)1月5日

発明の数 1
審査請求 有

(全 3 頁)

④ 補酵素Q₉の製造法

三鷹市大沢2-20-32

① 特 願 昭53-63382

② 出 願 昭53(1978)5月29日

⑦ 発 明 者 相田浩

浦和市大字根岸681-2

⑧ 発 明 者 内田欣哉

② 発 明 者 川田泉

横浜市保土ヶ谷区瀬戸ヶ谷町29
8-46

⑦ 出 願 人 相田浩

浦和市大字根岸681-2

⑧ 代 理 人 弁理士 久保田藤郎

明 細 書

1. 発明の名称

補酵素Q₉の製造法

2. 特許請求の範囲

1. シュードモナス属に属し補酵素Q₉の生産能を有する微生物を、イソペンテノールおよび/またはグラニオールを添加した培地に培養して補酵素Q₉を生成せしめ、これを採取することを特徴とする補酵素Q₉の製造法。

2. シュードモナス属に属し補酵素Q₉の生産能を有する微生物がシュードモナス・シュイルクイエンス (*Pseudomonas schuylikilliensis*) IAM / 092 および同 IAM - / / 26 のいずれかである特許請求の範囲第1項記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は補酵素Q₉の製造法に関し、さらに詳しくはシュードモナス属に属する微生物をイソペンテノールおよび/またはグラニオールを添加した培地に培養して補酵素Q₉を生成せしめ、これ

を採取することよりなる補酵素Q₉の製造法に関する。

補酵素Qは広く動植物および微生物等に含まれ、末端電子連鎖の構成成分として重要な役割を果たしていることが知られている。また、補酵素Qは各種疾病に対しすぐれた薬理作用、生理作用を示すことが明らかにされている。したがって、補酵素Q群の1つである補酵素Q₉も医薬品としての有用性が期待されている。

補酵素Q₉を得る方法としては、動植物組織や微生物菌体からの抽出および有機合成法等が考えられる。これらのうち動植物組織から抽出する方法は大規模に生産することが困難であり、また合成法は収率に関し難点があり、いずれも工業的手段としては不満足な方法である。これに反し、微生物から採取する方法は収量如何によつては十分に経済的に成立し得る可能性がある。

本発明者らは、先きにシュードモナス属細菌が補酵素Q₉を生成することを見出したが、さらに研究を重ね培地に添加して単位菌体量あたりの補

酵素 Q_9 の含量を、無添加の場合に比して著しく増大させる化合物の検索を行なつた。従来、補酵素 Q の生合成前駆体の中で、生育培地に添加したときに、その単位菌体あたりの補酵素 Q の含量を増大させる物質として、 p -ヒドロキシ安息香酸や酢酸もしくはその塩等が知られている。補酵素 Q のイソプレニ側鎖部分は、細胞内ではジメチルアリルピロリン酸にイソペンテニルピロリン酸が順次縮合を繰返し、ゲラニルピロリン酸、ファルネシルピロリン酸を経て生合成されることが知られている。しかし、これらの真の前駆体は細胞膜不透過のために、これを微生物の生育培地に添加し、補酵素 Q の生産を高める試みはこれまでなされていない。

そこで本発明者らは、種々の化合物について検討した結果、生育培地に添加したイソペンテノールおよび／またはゲラニオールが補酵素 Q_9 を生産するシュードモナス属細菌の細胞内に容易に取り込まれ、かつ単位菌体あたりの補酵素 Q_9 の含量を著しく増大させるという知見を得た。本発明

は上記の知見に基づきさらに研究を重ねた結果、完成されたものである。すなわち、本発明はシュードモナス属に属し補酵素 Q_9 の生産能を有する微生物を、イソペンテノールおよび／またはゲラニオールを添加した培地に培養して補酵素 Q_9 を生成せしめ、これを採取することを特徴とする補酵素 Q_9 の製造法を提供するものである。

本発明に使用する微生物はシュードモナス属に属し、補酵素 Q_9 を生産する能力を有するものであればよいが、特にシュードモナス・シュイルクリエンシス (*Pseudomonas schuylikilliensis*) IAM / 092, 同 IAM / 126 は補酵素 Q_9 を高収率で生産することができるので好ましい菌株である。

本発明を実施する場合に用いる培地について述べると、炭素源としてはグルコース、糖蜜等の糖質、その他シュードモナス属細菌の生育し得る炭素源であれば任意に使用できる。窒素源としては硫酸、塩安等の無機窒素化合物、コーンステープリカー、魚肉エキス、ペプトン、酵母エキス等

の有機窒素化合物などを適宜使用することができる。その他、無機塩類としてカリウム塩、ナトリウム塩、マグネシウム塩、リン酸塩、硫酸塩等を適宜用いる。

培養は通常、pH 4~8, 温度 25~35℃で 10~50 時間通気攪拌培養により行なう。本発明で使用するイソペンテノールまたはゲラニオールの添加方法、時期などは任意であり、たとえば培養始めあるいは培養途中で一度に添加するか、または醗酵状態に応じて分割して加える。これらの物質は最終濃度として通常 1×10^{-5} ~ 5×10^{-3} モル/ℓ, 好適には 5×10^{-5} ~ 5×10^{-4} モル/ℓ となるように添加する。

培養終了後、菌体から補酵素 Q_9 を抽出単離するには、たとえば培養液を遠心分離して得られた湿菌をアセトン等の親水性溶媒で抽出し、得られたアセトン抽出物から補酵素 Q_9 を含むフラクションを石油エーテル等の溶媒に転溶し、アルミナカラム等を用いて分別精製を行なつて単離することができる。なお、用途によつては補酵素 Q_9 を

単離しないで菌体を含んだまま用いることも可能である。

補酵素 Q_9 の同定はUVスペクトル、融点測定およびアセトン：水 (95:5) を展開溶媒とする逆相薄層クロマトグラフィー等により標準品と比較することにより行なつた。

次に、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

KH_2PO_4 0.05%, Na_2HPO_4 0.15%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, グルコース 1%, ペプトン 1%, 酵母エキス 0.2% を含む培地 (pH 7.0) 15ℓ を 30ℓ 容のジャーファーマンターに入れ、加圧滅菌後、10 ml のエタノールに溶解したイソペンテニルアルコール 64.5 mg を加えた。一方、上記組成の培地 500 ml に予め 24 時間培養しておいたシュードモナス・シュイルクリエンシス (*Ps. schuylikilliensis*) IAM / 126 株を上記培地に接種し、温度 27℃ の下で 15ℓ / 分の通気を行ない、かつ 300 回転 / 分で攪拌しつつ 24 時間

培養した。

培養終了後、培養液を遠心分離して湿菌体4/8g(乾燥菌体として87g)を採取した。

得られた湿菌体にアセトンを2g加え、攪拌抽出を行なった後、遠心分離により菌体を除いた。この操作を2回くり返して得られたアセトン抽出物を合し、減圧濃縮を行なつてアセトンを留去した。しかる後、残液を1gの石油エーテルにて抽出し、石油エーテル層を集めた。これを水洗後、芒硝で乾燥し濃縮した。この残液を少量の石油エーテルに溶解し、アルミナカラムを用いて石油エーテルとエチルエーテルの混合物で溶出して補酵素Q₉を含む画分を採取した。

この溶出液より溶媒を留去し、残渣を少量のエタノールに溶解して冷所に放置し、補酵素Q₉の粗結晶を得る。この粗結晶をエタノールから再結晶を3回くり返し、補酵素Q₉の結晶142.6mgを得た。

一方、イソペンテノールを添加しない上記培地15gに前記と同様の培養を行ない、かつ前記と

同様の方法により湿菌体3g(乾燥菌体として69g)を得た。得られた湿菌体から前記方法と同一の方法により補酵素Q₉の結晶81.42mgを得た。

以上の結果に基づき補酵素Q₉の生成、蓄積に及ぼすイソペンテノールの効果を比較すると、培地にイソペンテノールを添加したことにより補酵素Q₉は培養液1g当たり75%増加し、乾燥菌体1g当たりでは約39%増加した。したがって、補酵素Q₉の生産におけるイソペンテノール添加効果が明確に認められた。

実施例 2

イソペンテノール645mgの代りにグラニオール1.16gを培地に添加したこと以外は実施例1と同様にして培養し湿菌体390g(乾燥菌体として68g)を得た。これを実施例1に記載した方法と同一の操作を行ない補酵素Q₉の結晶104.7mgを得た。

一方、同一菌株についてグラニオール無添加の培地で培養を行ない湿菌体327g(乾燥菌体と

して63g)を得、次いでこの菌体を処理して補酵素Q₉の結晶74.3mgを得た。

以上の結果に基づいて補酵素Q₉の生成、蓄積に及ぼすグラニオールの効果を比較すると、培地にグラニオールを添加することにより補酵素Q₉が培養液1g当たり約41%の増加、また乾燥菌体1g当たり約30%の増加となつた。

実施例 3

シュードモナス・シユイルキリエンス(*Ps. schuylikilliensis*) IAM/092株を用いて実施例1と同様の実験をくり返したところ、イソペンテノールを培地に添加することにより補酵素Q₉は培養液1g当たり53%も増加し、また乾燥菌体1g当たりでは48%の増加となつた。

特許出願人 相 田 浩
代 理 人 弁理士 久 保 田 藤 郎